

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID  
FACULTAD DE ODONTOLOGÍA

# **Evaluación de la regeneración ósea *in vivo* de cerámicas de HAp activadas con PRP y quitosano/rhBMP-2**

Trabajo Fin de Máster  
Máster en Ciencias odontológicas  
Madrid, 2013-2014

Lidia Fernández Sierra







UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID. Facultad de Odontología

**TRABAJO DE FIN DE MÁSTER**  
**VISTO BUENO DEL TUTOR**  
**MASTER OFICIAL EN CIENCIAS ODONTOLÓGICAS**

***El profesor/a tutor***

Nombre y apellidos:

Juan López-Quiles Martínez

***del alumno/a***

Nombre y apellidos

Lidia Fernández Sierra

***encuadrado en la línea de investigación***

Cirugía reconstructiva bucal y maxilofacial

**DA EL VISTO BUENO**

para que el Trabajo de Fin de Máster titulado

Evaluación de la regeneración ósea in vivo de cerámicas de HAp activadas con PRP y quitosano/rhBMP-2.

sea admitido para su defensa ante Tribunal.

En Madrid , a 3 de septiembre de 2014.

Fdo: el profesor/a

El presente Visto Bueno se debe acompañar del Trabajo de Investigación en formato electrónico y una copia en papel (no es necesaria su encuadernación)





UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID. Facultad de Odontología

## TRABAJO DE FIN DE MÁSTER VISTO BUENO DEL TUTOR

MASTER OFICIAL EN CIENCIAS ODONTOLÓGICAS

### ***El profesor/a tutor***

Nombre y apellidos:

Ana Civantos Fernández

### ***del alumno/a***

Nombre y apellidos

Lidia Fernández Sierra

### ***encuadrado en la línea de investigación***

Cirugía reconstructiva bucal y maxilofacial

### **DA EL VISTO BUENO**

para que el Trabajo de Fin de Máster titulado

Evaluación de la regeneración ósea in vivo de cerámicas de HAp activadas con PRP y quitosano/rhBMP-2.

sea admitido para su defensa ante Tribunal.

En Madrid , a 3 de septiembre de 2014.

Fdo: el profesor/a

El presente Visto Bueno se debe acompañar del Trabajo de Investigación en formato electrónico y una copia en papel (no es necesaria su encuadernación)



# ABREVIATURAS

- BMP: Proteína morfogenética de hueso.
- TGF- $\beta$ : Factor de crecimiento transformante  $\beta$ .
- rhBMP: forma recombinante humana de la proteína morfogenética de hueso.
- MSC: Células madre mesenquimales.
- PRP: Plasma rico en plaquetas.
- PDGF: Factor de crecimiento derivado de plaquetas.
- VEGF: Factor de crecimiento del endotelio vascular.
- EGF: Factor de crecimiento epidérmico.
- HAp: Hidroxiapatita.
- B-TCP: Fosfato  $\beta$ -tricálcico.
- PRGF: Plasma rico en plaquetas y factores de crecimiento.
- $\mu$ -CT: Microtomografía computerizada.
- TM: Tinción de tricrómico de Masson.





# ÍNDICE

	Página
1. INTRODUCCIÓN	1
2. JUSTIFICACIÓN	17
3. OBJETIVOS	19
4. MATERIALES Y MÉTODOS	20
5. RESULTADOS	27
6. DISCUSIÓN	37
7. CONCLUSIONES	44
8. BIBLIOGRAFÍA	45



# **I. INTRODUCCIÓN**

# 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1. Ingeniería de tejidos y regeneración tisular

La ingeniería de tejidos es un campo multidisciplinar que requiere del apoyo de diferentes ramas de la ciencia como medicina, ingeniería de los materiales o bioquímica y biología molecular. Se sustenta en la combinación de tres elementos fundamentales como son los biomateriales, las células y las moléculas biológicamente activas para crear tejidos funcionales. El objetivo de la ingeniería de tejidos es desarrollar estructuras que restauren, mantengan o mejoren los tejidos dañados u órganos completos. Su fundamento esencial es el uso de células vivas que se multiplican en matrices extracelulares, de origen natural o sintético, creando sustitutos biológicos para su consecuente implantación en el cuerpo (Sipe, J.D., 2002). La odontología y la ingeniería de tejidos han encontrado un campo común de experimentación y desarrollo en el estudio de la regeneración ósea.

La ingeniería de tejido óseo implica el uso de factores de crecimiento osteogénicos, por ejemplo la proteína morfogenética ósea 2 (BMP-2), células madre mesenquimales, y un andamio para guiar el crecimiento del hueso y proporcionar apoyo (Runyan, C.M. y cols, 2014). El mecanismo de la mineralización del tejido óseo es un evento complejo que involucra células preosteoblásticas, eventos físico-químicos y un marco constituido por moléculas presentes en la matriz orgánica. Las proteínas de la matriz también juegan un papel importante en este proceso como factores de regulación y/o de nucleación en el depósito de cristales de hidroxiapatita, formados por iones de calcio y fosfato presentes en el plasma y los fluidos extracelulares, en el espacio entre las moléculas de colágeno (Carreira, A.C. y cols., 2014). Las principales aplicaciones de la ingeniería de tejido óseo en el ámbito de la cirugía bucal y maxilofacial son la regeneración tisular de defectos maxilares (causadas por resecciones tumorales, infecciones, traumatismos, malformaciones congénitas o deficiencias óseas por la edad) y el área de la implantología, ya que la pérdida dentaria interfiere en la correcta masticación, en el habla y disminuye la confianza en las interacciones sociales (Hollister, M.C. y cols., 1993).

Los implantes pueden ser divididos en tres grupos: autoinjertos, aloinjertos y xenoinjertos. El injerto óseo autólogo es el tratamiento estándar para la reconstrucción de defectos maxilares así como para superar la cantidad insuficiente de hueso en la colocación de implantes en la zona receptora, ya que cumple con los criterios de curación específicos de la osteogénesis, osteoinducción y osteoconducción. Además, el material autógeno es no inmunogénico. Sin embargo, la escasez de la oferta y la morbilidad de la zona donante han llevado a la búsqueda de alternativas. Es obvio que los problemas éticos y las cuestiones de histocompatibilidad impedirían el uso de los xenoinjertos. Los aloinjertos, especialmente los sintéticos, tienen ventajas significativas, incluyendo la falta de problemas éticos, la posibilidad de su ilimitada adquisición, disponibilidad de varios tamaños y formas, así como los procedimientos de obtención sin complicaciones, lo que determina la gran perspectiva de estos materiales sintéticos como implantes y para su uso en ingeniería de tejido óseo (Guo, J. y cols., 2012). Sin embargo, la posible transmisión de enfermedades, la inmunogenicidad, y la variabilidad de productos al proceder de diferentes donantes han limitado su uso (Kim, J. y cols., 2014). Afortunadamente, con el desarrollo de la investigación en células madre y el estudio de nuevos biomateriales, la ingeniería de tejidos ósea podría ser desarrollada como una alternativa para lograr mejores resultados en la regeneración ósea oral y maxilofacial.

La ingeniería de tejidos propone alternativas para la administración de moléculas bioactivas o factores de crecimiento al sitio concreto de regeneración. Éstos juegan un papel importante en la comunicación entre las células y sus microambientes en los tejidos, la transferencia de señales reguladoras de la adhesión celular, la migración, la proliferación y la expresión génica. La incorporación de las moléculas a materiales biodegradables y biocompatibles favorece la diferenciación y proliferación celular y, de este modo, aceleran el proceso de regeneración ósea. Entre estos factores destacan las BMPs, capaces de inducir la formación de células osteoblásticas desde células pluripotentes (Wang, E. A. y cols., 1990).

### 1.2- Principios moleculares de actuación de las proteínas morfogenéticas óseas

Las BMPs pertenecen a la superfamilia del factor de crecimiento transformante- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) las cuales intervienen de forma activa en la regulación de diferentes procesos como la

proliferación celular, la diferenciación, la apoptosis, la quimiotaxis, la angiogénesis y, además, participan en el desarrollo de la mayoría de los tejidos y órganos en vertebrados. Se sintetizan como grandes moléculas precursoras, y la proteína madura se libera de una región propeptídica por escisión proteolítica. Gracias a técnicas de ingeniería genética se ha conseguido obtener la forma recombinante humana de la proteína BMP-2 (rhBMP-2). Las BMPs se encuentran formadas por dos subunidades interconectadas por enlaces disulfuro, siendo activos como homodímeros (de cadenas idénticas) y como heterodímeros (de dos cadenas diferentes).

Actualmente se han identificado al menos 15 BMPs (Tabla 1), que se encuentran divididas en diferentes subfamilias atendiendo a las similitudes en la secuencia de aminoácidos. La mayoría de ellas son citoquinas multifuncionales, a excepción de la BMP-1 la cual es una metaloproteasa y no pertenece a esta superfamilia TGF- $\beta$ , destacando BMP-2, BMP-4, BMP-6, BMP-7 y BMP-9, como las proteínas que han demostrado presentar mayor actividad osteoinductora y capacidad de formación de hueso ectópico (Kempen, B. y cols., 2008; Bragdon, D.R. y cols., 2011).

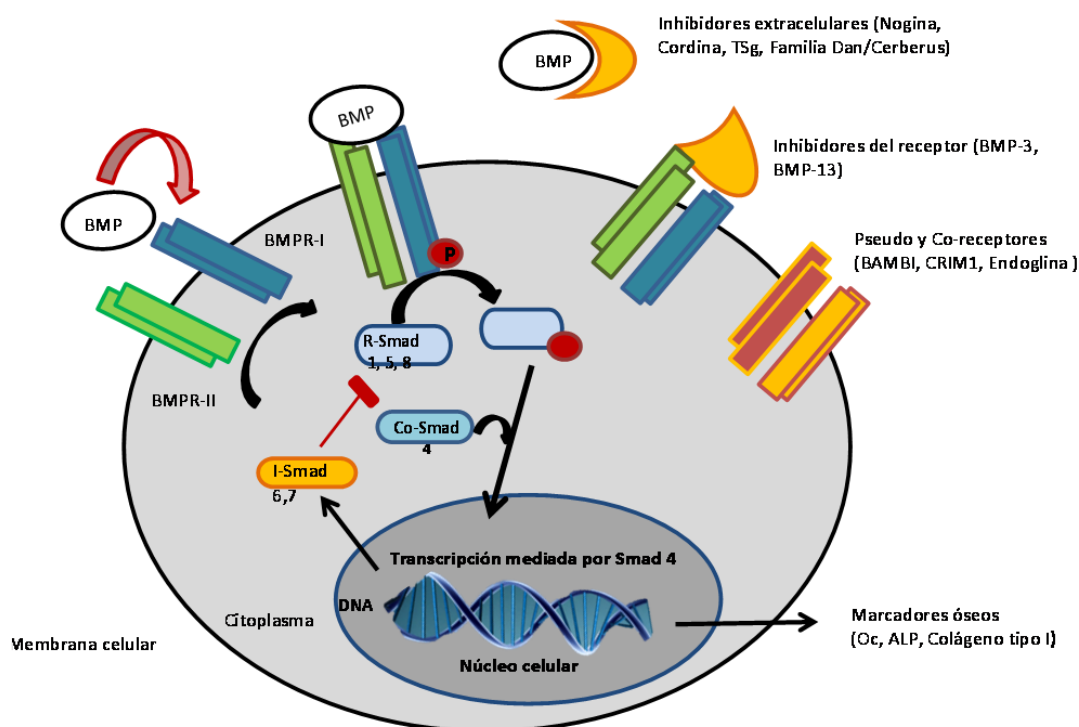
Durante el proceso de curación de una herida, las BMPs contribuyen a la acumulación de células madre mesenquimales (MSC), responsables del proceso de formación de tejido nuevo, mediante quimiotaxis. Las fuentes de MSCs son la médula ósea, el periostio, los pericitos y las MSC circulantes. La rhBMP-2 regula a las MSCs en la diferenciación a osteoblastos para el desarrollo de hueso intramembranoso o, por otro lado, actúa sobre los condrocitos para el desarrollo de cartílago y remodelación para la formación endocondral de hueso (Cunningham, N.S. y cols., 1992).

La BMP-2 se ha identificado originalmente por su capacidad para inducir la formación de hueso y cartílago cuando se implanta en tejidos no óseos *in vivo*. Ejerce su efecto a través de su unión a receptores específicos serina-treonina quinasa, tipo 1A (BMPRI1A), tipo 1B (BMPRI1B) y tipo 2 (BMPRI2). El receptor de BMP tipo 2 se activa por la unión de la BMP-2 e induce la oligomerización del complejo receptor, lo que resulta en la fosforilación del receptor tipo 1 y el reclutamiento por señalización de las proteínas Smad1, Smad5 y Smad8 que se pueden unir a un mediador común Smad4 en un complejo heterodimérico que se transloca al núcleo celular donde induce la expresión de

genes de respuesta tales como Runx-2 que median la actividad osteogénica de la BMP-2 (Figura 1) (Groeneveld, H.J. y Burger, E.H., 2000; Wang, L. y cols, 2013). La expresión de Runx-2 también regula la expresión de los genes que sintetizan las proteínas de la matriz extracelular ósea, sialoproteína, osteocalcina y colágeno tipo I. La rhBMP-2 tiene una fuerte osteoinductividad, ya que induce la expresión de marcadores osteogénicos, tales como fosfatasa alcalina y la osteocalcina a través de la proteína quinasa activada por mitógenos. Se ha observado que la rhBMP-2 finaliza su efecto local en cuestión de horas y a partir de entonces comienza su efecto sistémico (Jun, S. y cols., 2013; Ruhé, P.Q. y cols., 2005).

**Tabla 1.** Familia de las proteínas morfogenéticas óseas.

<b>BMP</b>	<b>Función principal</b>
BMP-2	Osteoinductiva, diferenciación osteoblástica, apoptosis
BMP-3	BMP más abundante en hueso, inhibe osteogénesis
BMP-4	Osteoinductiva, desarrollo de pulmón y ojo
BMP-5	Condrogénesis
BMP-6	Diferenciación osteoblástica, condrogénesis
BMP-7	Osteoinductiva, desarrollo de riñón y ojo
BMP-8	Osteoinductiva
BMP-9	Sistema nervioso y reticuloendotelial hepático, hepatogénesis
BMP-10	Desarrollo cardíaco
BMP-11	Tejido neuronal y mesodérmico
BMP-12	Induce formación tejido tendón-iliaco
BMP-13	Induce formación tendón y ligamento
BMP-14	Condrogénesis, mejora reparación tendón y formación de hueso
BMP-15	Modifica la actividad de hormona folículo estimulante



**Figura 1.** Esquema de la ruta de señalización celular de la rhBMP-2 vía Smad. La rhBMP-2 interacciona con los receptores tipo I y tipo II produciendo la activación de moléculas de señalización intracitoplasmática Smad (A). Los complejos Smad activos son translocados al núcleo para interaccionar con los factores de transcripción necesarios para mediar la activación del gen objetivo (B) (Civantos, A. 2014).

Las proteínas osteoinductoras requieren de un material portador que sirva como sistema de entrega y como andamio para el crecimiento celular. Entre los diversos factores de crecimiento, la rhBMP-2 es el factor de crecimiento más eficaz para el crecimiento del hueso y la reconstrucción, sin embargo, se requiere en grandes dosis, ya que se degrada y se desactiva rápidamente. No obstante, se ha demostrado que la implantación directa de altas dosis de rhBMP-2 induce el proceso de inflamación que puede causar la obstrucción de las vías respiratorias cuando se aplica en áreas orales y cervicales. Por lo tanto, hay una necesidad de utilizar transportadores que permitan la liberación controlada y sostenida del factor de crecimiento (Yoshida, K. y cols., 2013; Jun, S. y cols., 2013). Así mismo debe impedir la entrada de tejidos blandos a la zona de regeneración ósea y debe absorberse lentamente mientras ésta se produce. El colágeno es uno de los materiales portadores de factores de crecimiento mejor descritos, pero se degrada muy rápidamente y posee unas propiedades mecánicas insuficientes (Jung, R.E.



y cols., 2003). El biomaterial en sí puede influir directamente en la diferenciación celular y puede potenciar la actividad de la BMP mediante la unión a la proteína y presentarla a la célula diana. Por otra parte la liberación lenta de BMP puede proporcionar una concentración fisiológica de proteína libre en el entorno del implante que puede atraer a las células diana a dicha zona por quimiotaxis (Ohyama T. y cols., 2004; Ruhé, P.Q. y cols., 2004).

### 1.3- El proceso de osificación y osteogénesis

El hueso tiene un potencial considerable para la reparación y la regeneración, y las etapas de la reparación de la fractura recapitulan secuencialmente las etapas de la formación de hueso endocondral embrionario. Una cascada celular que imita el desarrollo de hueso endocondral embrionario puede ser inducida localmente mediante la implantación de una matriz ósea desmineralizada de forma ectópica. Los eventos celulares y bioquímicos de esta matriz inductora de formación ósea endocondral han sido bien caracterizados. Tras la implantación de la matriz ósea desmineralizada hay una inmigración transitoria de leucocitos polimorfonucleares en el día 1. Esto es seguido por la migración y el apego de células mesenquimales a la matriz al tercer día. Estas células mesenquimales progenitoras proliferan y se diferencian en condroblastos y condrocitos en los días 6 y 7. La vascularización del implante se produce concomitantemente con la calcificación de la matriz del cartílago hipertrófico en el día 9, y el cartílago es reabsorbido y reemplazado por hueso nuevo en los días 10-12. El remodelado óseo (días 12-18) y la diferenciación de células hematopoyéticas resultan en la formación completa de hueso con todos los elementos medulares asociados durante el día 21 (Cunningham, N.S. y cols., 1992; Guzmán, R. y cols., 2014).

Por otra parte, la osificación intramembranosa tiene lugar directamente en el tejido conectivo. Por este proceso se forman los huesos planos de la bóveda del cráneo: hueso frontal, hueso occipital, hueso parietal y hueso temporal. La mayor información relacionada con la osteogénesis intramembranosa proviene de la investigación de los huesos frontal y parietal, cuyas condensaciones mesenquimales se inician en la cresta supraorbital.

A diferencia de la osificación endocondral, donde se produce la mineralización inicial a partir de una estructura cartilaginosa similar a la forma del hueso adulto, la etapa inicial de la osteogénesis intramembranosa es la mineralización de un marco de colágeno producido por los osteoblastos diferenciados dentro de una rápida expansión de células mesenquimales.

Un proceso clave en la osteogénesis es la vascularización, la cual se observa en la transición de preosteoblastos a osteoblastos durante el desarrollo y la curación de una fractura. Dentro de este proceso, las BMPs inducen la expresión y secreción de factores de crecimiento vasculares endoteliales  $\alpha$  (VEGF- $\alpha$ ). En los osteoblastos, este factor juega un papel importante en el acoplamiento de la formación de hueso y de la angiogénesis, actuando como un quimioatrayente para células vecinas endoteliales (Deckers, M.M.L. y cols., 2002; Li, G. y cols., 2005; Fiedler, J.Ö. y cols., 2002). La proliferación vascular en relación a las condensaciones preosteoblásticas durante la formación de hueso *de novo* favorece la transición de MSCs a fenotipo osteoblástico.

Antes de la diferenciación, las células precursoras de los osteoblastos deben formar uniones mediadas por integrina para que se unan a moléculas extracelulares de la matriz. Las integrinas son receptores transmembrana que interaccionan con la unión a determinadas secuencias de péptidos de las moléculas del espacio extracelular (Arnaout, M.A. y cols., 2002). Estas secuencias peptídicas se encuentran en numerosas proteínas de matriz extracelular, incluidas fibrina, colágeno, fibronectina, vitronectina, osteopontina y sialoproteína ósea.

Así, los preosteoblastos se guían por contacto con las proteínas de matriz extracelular por mediación de la integrina, y a su vez, los osteoblastos maduros establecen una comunicación con la matriz extracelular a través de las integrinas, adecuando su secreción al estado del medio externo (Schneider, G.B. y cols., 2004; Rezania, A. y Healy, K.E. 1999). Mediante estas moléculas, se puede transferir al núcleo celular información sobre el estrés y la tensión de la matriz extracelular, dando como resultado la síntesis y secreción de proteínas óseas o matriz de mantenimiento.

Los osteoblastos inician la formación ósea a través de secreción de la matriz osteoide, una matriz ósea no mineralizada. Más tarde, continúan su aporte mediante vesículas especiales llamadas vesículas de matriz, aportando minerales de apatita y fosfatasa

alcalina. El contenido de las vesículas de matriz interactúa con el colágeno y otras proteínas de la matriz extracelular para formar la matriz mineralizada.

Los osteoblastos rodeados de su matriz mineralizada se convierten en osteocitos. Esta formación ósea temprana es menos organizada. El hueso compacto se forma por engrosamiento de las trabéculas hasta que desaparecen los espacios que rodean los vasos sanguíneos típicos del hueso esponjoso. Las fibras de colágeno se vuelven más ordenadas, finaliza el engrosamiento trabecular en el hueso esponjoso y el tejido conjuntivo se transforma en el periostio. Las fuerzas de tensión y deformación conducen a los osteoclastos a la remodelación y la formación de hueso maduro, identificado por la organización de los sistemas de Havers, que son las unidades funcionales del hueso. La formación de hueso maduro continúa con la síntesis de osteona cortical y los componentes de la médula ósea. Los osteoblastos superficiales se transforman en células de aspecto fibroblástico que persisten como elementos osteoprogenitores en reposo ubicados en el endostio o el periostio pudiéndose transformar de vuelta en osteoblastos si es necesario. (Percival, C.J. y Richtsmeier, J.T. 2013).

#### 1.4- Plasma Rico en Plaquetas como fuente de factores de crecimiento

Se ha demostrado que la respuesta biológica óptima de rhBMP-2 depende de la combinación adecuada entre el factor de crecimiento y el andamio. Por lo tanto, el efecto positivo que le aporte al factor de crecimiento depende en gran medida de las propiedades de ese andamio que debe proporcionarle las condiciones óptimas.

En la regeneración ósea, la presencia prolongada de BMP-2 en el entorno es proporcionada por la unión de la BMP-2 a la matriz extracelular. En situaciones terapéuticas, esta presencia prolongada de BMP-2 se ha correlacionado con un incremento en el crecimiento del hueso. La matriz que se forma durante el proceso de curación natural es una matriz de fibrina que puede ser invadida por las células y rápidamente reemplazada por la actividad proteolítica asociada a las células.

Una fuente natural de fibrinógeno y factores de crecimiento es el Plasma rico en plaquetas (PRP). Las plaquetas son células anucleadas derivadas de los megacariocitos que juegan un papel importante como fuente de factores de crecimiento, incluyendo el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), factor de crecimiento

transformante (TGF- $\beta$ ), factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) y factor de crecimiento epidérmico (EGF). Éstos mismos son almacenados en los gránulos de las plaquetas y se liberan a través de su activación por diversos estímulos. El PRP se utiliza clínicamente en el ámbito odontológico como un producto de sangre autóloga para estimular la regeneración de tejido en los defectos periodontales, en los alvéolos post-extracción, durante la colocación de implantes, y en la regeneración ósea guiada alrededor de los implantes. Se cree que la capacidad del PRP para estimular la regeneración ósea es debido a las actividades estimuladoras de esos factores de crecimiento liberados de las plaquetas activadas en la proliferación de células progenitoras (Tomoyasu, A. y cols., 2007). Cuando las plaquetas se activan por trombina o calcio, estos factores son liberados. El PRP puede ser obtenido mediante el secuestro y la concentración de plaquetas autólogas por centrifugación. Se ha demostrado que los injertos de hueso autólogo que se aplican en combinación con el PRP derivan en un aumento de la densidad ósea (Marx, R.E. y cols., 1998). Estudios *in vitro* mostraron que la combinación de ciertas citoquinas y factores de crecimiento aumentan la proliferación y diferenciación de los osteoblastos (Kessler, S. y cols., 2000). Por lo tanto, el PRP es un buen candidato como sistema de aporte de factores de crecimiento, pues procede de una autotransfusión evitando un posible rechazo y el riesgo de transmisión de enfermedades (Jung, R.E. y cols., 2005).

### 1.5- La hidroxiapatita como material de sustitución ósea

Como ya se ha mencionado, las moléculas activas requieren de un material portador biocompatible y no tóxico que sirva como soporte para que las MSC migren al sitio específico de interés y permita el crecimiento celular. En este concepto es donde se aplica la ingeniería de tejidos de injerto óseo sintético que consiste en un material osteoconductor de soporte que se combina con las células osteogénicas y / o proteínas osteoinductivas.

Ese material de soporte debe, a su vez, impedir la entrada de tejidos blandos a la zona de regeneración ósea y debe absorberse lentamente mientras ésta se produce, con una velocidad de biodegradación controlada que se ajuste a la velocidad de reparación del defecto óseo. Estas estructuras tridimensionales porosas deben ser de fácil preparación, con una resistencia mecánica suficiente y con propiedad osteoconductiva. El diseño de

su superficie ha de permitir un comportamiento similar al de la matriz extracelular. Además, las propiedades de estos materiales pueden verse mejoradas mediante moléculas bioactivas que estimulen el proceso regenerativo (Lanza, R.P. y cols., 2000; Alam, M.I. y cols., 2001).

Partiendo de todas estas características se han creado diferentes compuestos, testados *in vitro*, y aplicados a estudios *in vivo*. Estos materiales se pueden clasificar en:

- Materiales orgánicos naturales: Colágeno, ácido hialurónico y derivados, quitosano
- Materiales orgánicos sintéticos: Ácido poliglicólico, ácido poliláctico, ácido poliláctico-co-glicólico, poli- $\epsilon$ -caprolactona y copolímeros
- Materiales inorgánicos: Hidroxiapatita (HAp), fosfato  $\beta$ -tricalcico ( $\beta$ -TCP) (Ashammakhi, N. y Ferretti, P. 2003; Xiao, W. y cols., 2013 )

Por una parte, los materiales biológicos muestran inmunogenicidad, y por otra, existe una gran dificultad para incorporar BMP a los polímeros sintéticos y para fabricarlos en las formas deseadas. Por ello, las cerámicas de fosfato cálcico como la HAp y el  $\beta$ -TCP se han utilizado en biotecnología y medicina como transportadores celulares y materiales de relleno óseo, sobre todo por sus propiedades químicas muy semejantes a las de la matriz ósea, pero también por su biocompatibilidad y poder osteoconductor, aunque carecen de la capacidad de osteoinductividad (Alam, M.I. y cols., 2001; Cai, Y. y cols., 2014).

Se dice que el sustituto óseo ideal debe ser osteogénico, osteoinductivo y osteoconductor:

- El término osteogénesis hace alusión a la formación y desarrollo de hueso en sentido genérico. Un material es osteogénico si se deriva o se compone de tejido involucrado en la formación de hueso.
- La osteoinducción es el proceso de estimulación de la osteogénesis. Para que un injerto sea osteoinductivo es preciso que sea capaz de formar hueso en áreas donde no se forma normalmente.
- Se entiende como osteoconducción a la capacidad de ciertos materiales de formar una matriz a través de la cual se puede depositar nuevo hueso. Los injertos osteoconductivos permiten la proliferación del tejido óseo desde las zonas anatómicas óseas preexistentes (Beca, T. y cols., 2007).

Las cerámicas de fosfato de calcio son materiales que pueden ser inyectados directamente en un defecto óseo donde se observa una rápida deposición de hueso nuevo en su superficie, y mantienen su forma y estabilidad durante este proceso. Para mejorar el crecimiento del tejido, la velocidad de degradación del cemento y para permitir introducir sustancias bioactivas solubles, se han desarrollado métodos para aumentar la porosidad del cemento creando macroporos, aunque se sabe que dicha degradación es dependiente de la especie, el lugar de implantación, y el tamaño de implante. Sin embargo, dicha porosidad limita su utilización en áreas de carga, dado que para facilitar el crecimiento óseo y la vascularización, los poros deben tener un diámetro superior a 100  $\mu\text{m}$ . Los poros pueden clasificarse como microporos, cuando poseen un tamaño menor de 10  $\mu\text{m}$ , o macroporos, cuando tienen un diámetro entre 100  $\mu\text{m}$  y 500  $\mu\text{m}$ , tamaño a partir del cual se produce el crecimiento óseo en los intersticios del implante (Ruhé, P.Q. y cols., 2004; Xu, H.H.K. y Simon, C.G., Jr 2005). Estos sustitutos óseos aloplásticos son muy prometedores para evitar la desventaja de los autoinjertos de la posible transmisión de infecciones.

La HAp ( $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ ), una fase cristalina de fosfato de calcio, es un componente inorgánico del hueso que se ha utilizado comúnmente como un material de injerto óseo por sus propiedades osteoconductoras y angiogénicas, como se ha demostrado a través de estudios *in vitro* e *in vivo*. *In vivo*, el incremento de iones calcio y fosfato liberados por la HAp conduce a la precipitación de cristales y a la formación de una capa carbonatada de fosfato de calcio con la incorporación de una matriz de colágeno. Esto es beneficioso para el crecimiento óseo y la remodelación en la interfase hueso-implante, y lograrse así, una fijación biológica a través del crecimiento bidireccional de una capa de unión (Cai, Y. y cols, 2014). Además, los andamios porosos de hidroxiapatita tienen la ventaja de la promoción de la nueva regeneración ósea y el desarrollo de una red de vascularización permitiendo el crecimiento del hueso en sus estructuras. Sin embargo, se han descrito casos en los que cuando se emplea HAp en forma de bloque provoca necrosis y perforación de la mucosa cercana al material. Las propiedades osteogénicas de este material de andamiaje se pueden mejorar mediante la inmovilización o encapsulación de factores de crecimiento dentro de ellos.

En clínica, la HAp se emplea como recubrimiento de implantes dentales, existiendo diferentes técnicas para ello, como son: pulverización de plasma, precipitación y deposición de aerosol. Aunque la técnica de pulverización de plasma proporciona el

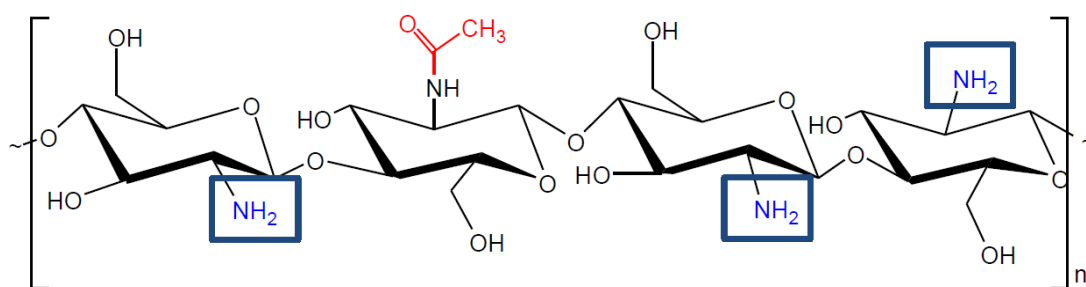
poder de unión más fuerte a la superficie del metal, no puede liberar otros componentes orgánicos, tales como proteínas o fármacos. Además, es un proceso complejo y daña la microestructura de la HAp. La precipitación es una técnica relativamente simple y puede aportar los componentes orgánicos en la superficie del implante, sin embargo, el poder de unión entre el recubrimiento y el metal es más débil, y el revestimiento puede ser fácilmente eliminado durante la inserción del implante. La técnica de deposición de aerosol se ha introducido recientemente y proporciona un poder de unión razonable entre el recubrimiento y el metal. Además permite liberar proteínas o drogas. (Lee, S. y cols., 2014; Yokoyama, A. y cols., 2002).

Las variaciones en la microporosidad tienen una gran influencia en la resistencia a la tracción, por lo que las cerámicas de fosfato de calcio son relativamente frágiles. Estos biomateriales deben asociarse a otros biomateriales, con características adecuadas, en áreas sometidas a cargas, con el fin de aumentar su resistencia a la fractura (Ruhé, P.Q. cols., 2005).

En el campo de la biomedicina se han descrito compuestos híbridos polímeros/inorgánicos que incorporan propiedades favorables de los dos componentes. Los más interesantes son aquellos de quitosano (modula ciertas propiedades como degradación o propiedades mecánicas) con fosfatos cálcicos como la HAp o el  $\beta$ -TCP (proporcionan refuerzo a la matriz y osteoconductividad).

#### 1.6- El quitosano como transportador de factores de crecimiento

El quitosano es un copolímero de N-acetilglucosamina y glucosamina unidas por enlaces  $\beta$  (1-4) procedente de la desacetilación alcalina de la quitina (Figura 2). La quitina, segundo polímero más abundante de la naturaleza, se localiza en el exoesqueleto de los crustáceos, moluscos, así como en la cutícula de insectos, y en la pared celular de los bacilos (Ikeda, T. y cols., 2014).



**Figura 2.** Estructura de la molécula de quitosano (Civantos, A., 2014)

La naturaleza catiónica del quitosano, debido a la presencia de grupos amino protonables en su estructura, es responsable de las interacciones electrostáticas con proteínas, lípidos, polisacáridos y ácidos nucleicos, estando presentes la mayoría en las membranas celulares.

Posee gran capacidad quelante y de adsorción de diferentes factores químicos y compuestos biológicos, principalmente debido a su naturaleza catiónica. Todas estas propiedades hacen de este biomaterial un vehículo muy atractivo para moléculas bioactivas en determinadas aplicaciones de la ingeniería de tejidos.

El quitosano satisface los requisitos más importantes que debe cumplir todo biomaterial aplicado en la ingeniería de tejidos. Es un polímero biocompatible, biodegradable y no tóxico. Además presenta carácter antibacteriano y buenas propiedades filmogénicas convirtiéndose en un candidato idóneo para el recubrimiento de superficies complejas en biomedicina (López-Lacomba, J.L. y col., 2006; Civantos, A, Tesis doctoral, 2014). Su biodegradación tiene lugar principalmente por la acción hidrolítica de la enzima lisozima (enzima proteolítica no específica presente en todos los tejidos del cuerpo humano) y en menor medida por otras enzimas proteolíticas como pepsina, papaína o pancreatina (Hirano, S. y cols., 1989).

Esta degradación depende del grado de desacetilación, que se conoce como la relación Glucosamina/N-acetilglucosamina. Cuanta mayor desacetilación exista, más lentamente se degrada. También influyen otros parámetros, como el peso molecular, el pH, o incluso, el método de obtención. La biodegradación produce oligosacáridos no tóxicos que son degradados por otras enzimas y eliminados o reabsorbidos fácilmente por el organismo. La velocidad de biodegradación influirá tanto en la funcionalidad como en



la biocompatibilidad, ya que una degradación demasiado rápida puede originar una reacción inflamatoria aguda asociada a la acumulación de productos de degradación (Ruhé, P.Q. y cols., 2005).

### 1.7- Antecedentes del grupo de investigación.

El laboratorio de Ingeniería de Tejidos dirigido por el Profesor José Luis López Lacomba y el Profesor José Sanz Casado, se encuentra en el Instituto de Estudios Biofuncionales de la Universidad Complutense de Madrid. Los trabajos que se realizan se centran en el estudio de nuevos materiales para su aplicación en la regeneración de tejido óseo, así como en la obtención de factores de diferenciación óseos con el mismo fin (Abarrategi, A. y cols., 2012; Lópiz-Morales, Y. y cols., 2010).

Los trabajos anteriormente realizados en el grupo permitieron desarrollar un protocolo optimizado para obtener diferentes tipos de proteínas activas (rhBMP-2, rhBMP-4, rhBMP-7) y desarrollar un biomaterial basado en quitosano en forma de película con elevada adherencia celular capaz de inmovilizar dichos factores.

Paralelamente se han realizado numerosos estudios en el laboratorio empleando otros materiales como cerámicas de  $\beta$ -TCP e HAp, discos de titanio con diferentes tratamientos superficiales, andamiajes de policaprolactona, nanotubos de carbón e incluso de hidrogeles.

Actualmente se trabaja en diferentes localizaciones anatómicas para la aplicación de los materiales estudiados. Estos ensayos se realizan en los modelos animales tales como ratones, ratas, conejos, perros, cerdos, ovejas y por último pollos.

Como consecuencia de las diferentes líneas de investigación iniciadas, se están obteniendo numerosos resultados materializados en contribuciones a congresos, artículos científicos, proyectos de investigación y colaboraciones con diferentes grupos y empresas.

Los desarrollos hasta ahora realizados han permitido la creación de una Empresa de Base Tecnológica, Noricum S.L., cuyo fin es la comercialización de proteínas morfogenéticas y la puesta en el mercado de implantes recubiertos con filmes de

quitosano activados con dichos factores (Patente Internacional PCT/ES01/00322) para la mejora de la oseointegración de los mismos.

## 2. JUSTIFICACION

Como se ha podido revisar en la Introducción, existe una larga tradición en el estudio de la capacidad de la rhBMP-2 para inducir la formación de hueso y cartílago cuando se implanta en sitios no óseos *in vivo*, es decir, ectópicamente. Desgraciadamente, la rhBMP-2 *in vivo* difunde rápidamente desde el sitio de implantación. De este modo, para un máximo efecto clínico es necesario un transportador adecuado que actúe como vehículo de liberación lenta y controlada de BMPs y que proporcione una concentración fisiológica de proteína libre en las inmediaciones del implante, que podría atraer a las células diana por quimiotaxis. El biomaterial puede, a su vez, influenciar directamente a la diferenciación celular y podría potenciar la actividad de la BMP mediante su unión a la proteína.

La gran variedad de biomateriales disponibles para la liberación controlada de este factor permite una gran libertad a la hora de elegir una posible opción óptima. En este sentido se han desarrollado filmes de quitosano capaces de inmovilizar la rhBMP-2. Estos filmes presentan una adecuada adhesión y proliferación celular y han demostrado con éxito la actividad osteoinductora de la proteína tanto *in vitro* como *in vivo* (López-Lacomba, J.L. y cols., 2006).

Por otra parte, aunque en varios estudios se ha descrito la combinación de factores de crecimiento con cerámicas de fosfato de calcio (como HAp y  $\beta$ -TCP), sólo unos pocos se han realizado con formaciones de cementos de fosfato de calcio y proteínas osteoinductoras. Los cementos fosfato de calcio empleados en estos estudios no tenían estructura macroporosa y los factores de crecimientos estaban en su mayoría añadidos al cemento antes de la formación de la estructura. Además, el andamio de cemento no estaba combinado, en esos estudios, con otro biomaterial que puede conferir características favorables, tanto mecánicas como de liberación del factor osteoinductor: el quitosano (Ruhé, P.Q. y cols., 2004).

El PRP, a su vez, es un producto de sangre autóloga que estimula la regeneración de tejido óseo en defectos a través de las actividades estimuladoras que tienen los factores de crecimiento liberados por las plaquetas activadas sobre la proliferación de células progenitoras. Por ello, el PRP es un buen candidato como sistema de entrega para factores de crecimiento y diferenciación.

Utilizando como modelo la calota de conejo, en este Trabajo Final de Máster se va a analizar, desde el punto de vista de la ingeniería de tejidos, el efecto que tiene las cerámicas de hidroxiapatita porosas desarrolladas y recubiertas con quitosano, rhBMP-2 (entidad titular de la patente: Noricum S.L.) y PRP con la finalidad de emplearse en la reparación de tejido óseo.

### 3. OBJETIVOS

- Evaluar la biocompatibilidad de las cerámicas de HAp activadas con quitosano/rhBMP-2 y control (HAp y PRP) en el estudio *in vivo* utilizando como modelo animal la calota de conejo.
- Estudiar la biodegradación de las cerámicas de HAp activadas y control en el estudio *in vivo*.
- Analizar el grado de regeneración ósea de las cerámicas de HAp activadas y control en un estudio *in vivo*.

# **I. MATERIAL Y MÉTODOS**

## 4. MATERIAL Y MÉTODOS

### 4.1- Cerámica de hidroxiapatita

#### **Fabricación:**

Las cerámicas de HAp se fabricaron mediante la utilización de moldeo robotizado o *robocasting*. Esta técnica permite fabricar estructuras porosas de diversos materiales (polímeros, metales, cerámicos), y es especialmente interesante, ya que es posible fabricar piezas cerámicas con geometría externa y estructura interna similares a las del hueso.

Consta de tres partes principalmente:

- Diseño de la estructura por ordenador por capas, empezando en la capa inferior y consiguiendo una estructura 3D mediante el programa de diseño RoboCAD 3.0. Se pueden fabricar varias piezas idénticas automáticamente.
- Elaboración de una suspensión coloidal cerámica, también llamada tinta: mediante la preparación de una suspensión estable en agua con polvos cerámicos de HAp al 45%.

La estabilidad de las tintas se logró mediante la adición previa de una cantidad de dispersante Darvan C-N (R.T. Vanderbilt Company, Norwalk, EE.UU) en el agua y añadiendo el polvo en pequeñas cantidades. Para aumentar la viscosidad de la tinta se añadió una cantidad adecuada (7 mg/ml solución) de hidroxipropil metilcelulosa Methocel F4M (Dow Chemical Company, Midland, EE.UU) previamente disuelta en agua en una proporción de 5 %. Finalmente, la tinta fue gelificada mediante la adición de un volumen adecuado de solución floculante Polietilenimina PEI (Sigma-Aldrich, St. Louis, EE.UU.).

- Fabricación del andamiaje mediante moldeo robotizado utilizando un equipo de deposición robótica (3D Inks, Stillwater, OK, EE UU).

La tinta cerámica se introdujo en la jeringa inyectora. La deposición de las barras se hizo en un baño de aceite de parafina para evitar el secado no uniforme durante el montaje de las estructuras 3D.

Las piezas se construyen capa a capa siguiendo el diseño realizado por ordenador. El sistema robótico mueve la jeringa de inyección en las tres direcciones del espacio

mientras presiona la tinta a través de la punta de acero para crear la estructura tridimensional.

Los andamiajes fueron secados al aire durante 24 h a temperatura ambiente. Posteriormente, se introdujeron en un horno convencional y se secaron a 400°C durante 1 h, para evaporar los compuestos orgánicos. Transcurrido ese tiempo se elevó la temperatura hasta 1300 °C durante 2 h para completar la sinterización de las muestras (Pereira, F.H. 2010).

### **Caracterización:**

Se emplean muestras de cerámicas de hidroxiapatita al 45% del volumen. Se esterilizan un total de 40 muestras, de las cuales se van a utilizar finalmente 32, introducidas en eppendorf en grupos de 4.

La esterilización de las muestras se realizó empleando crisoles cubiertos con papel de aluminio que se introdujeron en una mufla (Vulcan™ A-130, NEY) a 150°C durante 1 hora. Una vez transcurrido el tiempo, se dejaron secar en desecador y posteriormente se almacenaron en un recipiente estéril en campana de flujo laminar vertical.

#### 4.2- Quitosano.

Se empleó para los ensayos un quitosano adquirido a la empresa Biolog (Alemania). El mismo se caracterizó en el Instituto de Estudios Biofuncionales presentando un contenido de humedad inferior al 10%, y de cenizas inferior al 1%. Libre de metales pesados (Hg y Pb inferiores a 0.01 ppm), su peso molecular promedio evaluado por viscosimetría capilar fue de 560.100 g/mol y su grado de desacetilación determinado por RMN-H<sup>1</sup> fue del 85%.

#### 4.3- Factores de crecimiento

**Proteína morfogenética de hueso-2 (BMP-2):** se obtuvo BMP-2 recombinante humana (rhBMP-2) mediante técnicas de ingeniería genética a partir de *E.coli*. La proteína fue donada por la empresa Noricum SL para la realización de este trabajo.



**Plasma Rico en Plaquetas (PRP):** El PRP se obtuvo de sangre autógena a través de un proceso que utiliza el principio de la separación celular por centrifugación diferencial, en el cual se extrae sangre del donante, se separan las distintas fases y se obtienen aquellas de mayor interés, según el caso. Se utiliza el PRP a modo de gel para mantener unidas entre sí las cuatro muestras de cerámica de HAp en el defecto óseo.

#### 4.4- Activación de las cerámicas

Las cerámicas de HAp (cuatro unidades) ya estériles se recubren con una solución de quitosano (100 µl, 1% p/v en ácido acético 50mM activado con 100 µg de rhBMP-2). La elaboración del filme de quitosano y la incorporación de la proteína en el mismo forman parte de la patente protegida por la empresa Noricum S.L.

La incorporación del PRP se realizará en el mismo acto quirúrgico.

#### 4.5- Ensayos *in vivo*

##### *Modelo animal*

Para evaluar la actividad *in vivo* de este tipo de cerámicas se realizaron dos defectos en cráneo, empleando cuatro conejos de raza Neozelandesa de 3,5 - 4 kg de peso.

##### *Obtención de PRP*

Previamente a la cirugía se realizó la extracción de sangre para la obtención de PRP de cada sujeto experimental. La secuencia del proceso es básicamente la siguiente:

- Punción venosa en la vena marginal en la oreja del conejo minutos antes de comenzar la cirugía (Figura 3A)
- Extracción de la sangre (400µL) a través de una cánula que permite la retirada de la sangre venosa. Ésta se almacena en tubos estériles con citrato sódico al 3,8% como anticoagulante listos para el proceso de centrifugación.
- Separación celular. Se centrifuga el plasma en una centrífuga digital que permita controlar los parámetros de tiempo y velocidad. El tiempo de centrifugación será de 8 minutos a 1.800 rpm (280 G), a temperatura ambiente (Figura 3B).

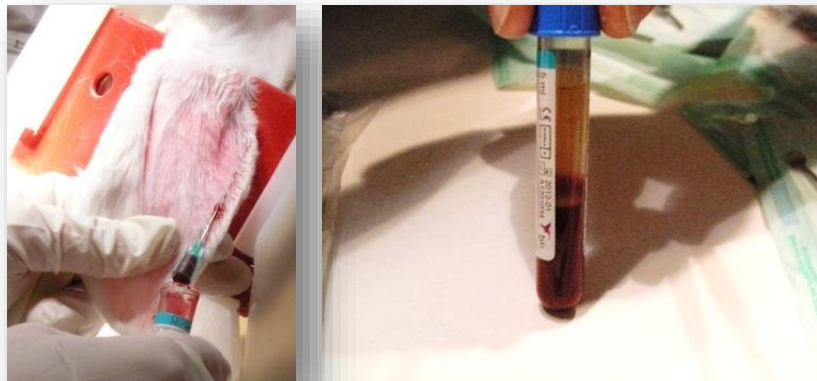
El plasma luego es separado mediante pipeteado muy meticuloso para no crear turbulencias en las fracciones obtenidas. Los primeros 500  $\mu$ l (0,5 cc.) es un plasma pobre en plaquetas y por lo tanto pobre en factores de crecimiento. Los siguientes 500  $\mu$ l corresponderán a un plasma con un número de plaquetas similar al que tiene la sangre periférica. La fracción de plasma más rico en plaquetas y factores de crecimiento (PRGF) son los 500  $\mu$ l que se encuentran encima de la serie blanca.

Una vez obtenido el PRGF, para provocar la formación del coágulo se añade el cloruro cálcico (20 $\mu$ L por cada eppendorf) y luego el injerto. Después de 2 a 5 minutos se obtendrá un agregado que contendrá el injerto, con una consistencia gomosa fácil de manipular.

Tras la obtención del PRP, los conejos se anestesiaron mediante inyección intramuscular en el muslo de 2% Rompun (1 mL/10 kg, Bayer) e Imalgene 1000 (ketamina 20 mg/kg, Merial). El cráneo se preparó y cubrió en condiciones estériles.

(A)

(B)



**Figura 3.** Extracción de sangre a través de la vena marginal de la oreja del conejo (imagen izquierda). Sangre centrifugada en un tubo estéril con citrato sódico al 3,8% como anticoagulante, donde se observa la separación celular.

#### *Procedimiento quirúrgico:*

Tras la anestesia del sujeto y la desinfección de la zona a intervenir, se realizó una incisión por planos: piel, músculo y periostio. En cada conejo, se realizaron dos defectos con una trefina de 8 mm de diámetro con irrigación constante de suero salino. En la parte izquierda del cráneo se colocó la cerámica control (HAp y PRP), mientras

que en el defecto parietal contralateral derecho se colocó la cerámica activada con quitosano/rhBMP-2. Este modelo se repite en los cuatro conejos intervenidos (Tabla 2.). Finalmente se procedió a la sutura del periostio mediante puntos simples y a la sutura continúa en ojal cutánea.

**Tabla 2.** Muestras colocadas en cada conejo. Las cerámicas control contienen únicamente las muestras de HAp y el PRP, y se van a colocar en las calotas izquierdas. Las cerámicas activadas contienen, además de las muestras de HAp y el PRP, quitosano y rhBMP-2, y se van a colocar en las calotas derechas.

CONEJO	CALOTA DERECHA	CALOTA IZQUIERDA
C1	HAp (1)+PRP+Q+BMP-2	HAp (3)+PRP
C2	HAp (2)+PRP+Q+BMP-2	HAp (5)+PRP
C3	HAp (4)+PRP+Q+BMP-2	HAp (7)+PRP
C4	HAp (9)+PRP+Q+BMP-2	HAp (8)+PRP

Tras un periodo de 4 semanas de implantación, los sujetos experimentales 1 y 2 fueron sacrificados, mientras que los especímenes 3 y 4 fueron sacrificados a las 12 semanas mediante inyección con pentobarbital sódico (Dolethal®).

Se procedió, tras ello, a la incisión para permitir el acceso directo a la zona previamente intervenida. Se realizaron unos cortes con la Dremel® para extraer una porción del cráneo de forma pentagonal que incluyese ambos defectos realizados en la primera cirugía.

Las muestras obtenidas se analizaron macroscópicamente, por  $\mu$ -CT y por histología.

*Estudio histológico:* las muestras se fijaron en paraformaldehído (PFA) al 4% en PBS y posteriormente, tanto el defecto con el injerto de la cerámica activada como el defecto con el injerto de la cerámica control fueron decalcificados con DECAL™, HistoLAB® durante 5 días. Después de la decalcificación, las muestras se deshidrataron en una

secuencia creciente de alcoholes (70-100, etanol absoluto), seguido de un tratamiento en xilol y posterior baño en parafina hasta embeber las muestras en bloques de parafina. Finalmente se cortaron dichos bloques en láminas de 8µm de grosor con un microtomo (Leica RM 2155) y se colocaron los cortes en portas Starfrost (Knittel Glass). Se empleó la tinción convencional de Tricrómico de Masson.

Para la tinción con tricrómico de Masson empleamos el siguiente protocolo:

1. Desparafinado: 30' de estufa y 10-15' de xilol.
2. Hidratación: Etanol absoluto, 96°, 80°, H<sub>2</sub>O: 5'
3. Hematoxilina de Weigert: 5'
4. Lavado H<sub>2</sub>O: 10' o 10 veces
5. Fucsina + Ponceau BS: 5'
6. Ácido fosfomolibdico : baños; 1°- 5'y 2°- 5'
7. Verde luz: 7'
8. H<sub>2</sub>O: 10' o 10 veces
9. Baño de ácido acético: 4'
10. Deshidratación: ETOH 80°, 96°, Absoluto: 5'
11. Xilol 5'
12. Montaje

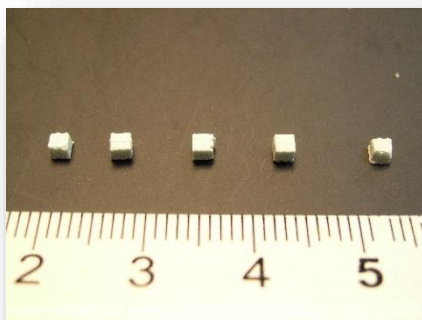
El montaje de los cortes en los portas se realizó con el kit de montaje de cubreobjetos, EUKIT (EMS), según las instrucciones del fabricante. Las muestras se examinaron y observaron empleando un microscopio Olympus BX51.

*Estudio de Microtomografía computarizada (µ-CT):* se realizó en las instalaciones del Instituto Pluridisciplinar de la UCM en la unidad de Cartografía cerebral. Se empleó un equipo Scanner PET / CT Albira ARS (GEM-IMAGING; Oncovision). El protocolo de adquisición fue de alta calidad (HR) a una resolución de 0,125 mm de tamaño de pixel, 45 kV/ 0,8 mA. El análisis de las imágenes se realizó con el programa Pmod 3.0 en el plano coronal.

### **III. RESULTADOS**

## 5. RESULTADOS

Se emplearon muestras, duras, blancas, cúbicas y de porosidad regular, de cerámica de HAp al 45% del volumen, con dimensiones de 2 mm de ancho, 2 mm de largo y 2 mm de altura y un peso promedio de 16 mg por cada muestra (Figura 4).



**Figura 4:** Cerámicas de HAp a implantar en los sujetos

Se llevaron a cabo estudios *in vivo*, en modelo animal de conejo, con el fin de obtener una visión directa del efecto producido por las cerámicas de HAp activadas y determinar así su capacidad osteoinductora.

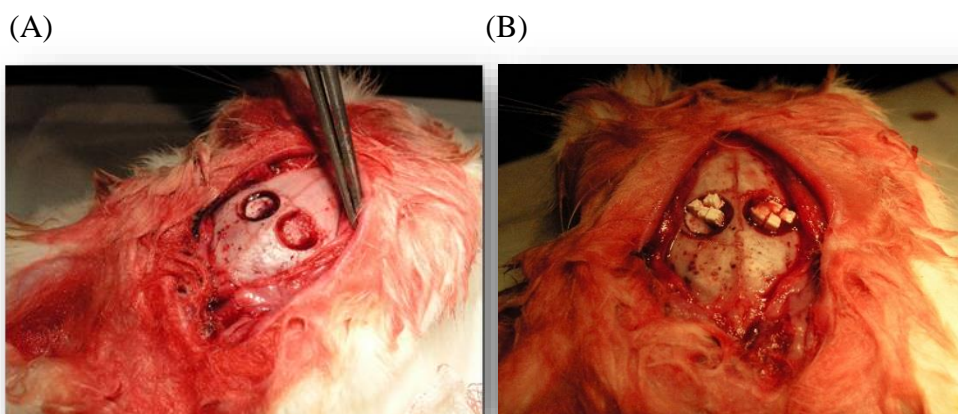
Para el experimento *in vivo*, las cerámicas control (HAp y PRP) y las cerámicas activadas con quitosano y rhBMP-2, se implantaron en defectos de tamaño no crítico en la calota de conejos de raza Neozelandesa.

El paso previo a la anestesia del sujeto y la desinfección de la zona a intervenir consistió en la extracción de sangre a través de la vena marginal localizada en la oreja del conejo. Tras la centrifugación de la misma, se obtuvo el PRP, el cual se pipeteó y se colocó en los recipientes que contenían las muestras a implantar para actuar de gel que las mantubiese unidas. De esta forma permanecieron en contacto el tiempo que transcurrió hasta su momento de colocación (al menos 10 minutos). Se realizó una incisión por planos, prestando especial atención al mantenimiento óptimo del periostio ya que el contacto íntimo de las muestras con el periostio vascularizado es útil para la reabsorción

y sustitución del implante. Además, el apoyo perióstico ayuda a determinar la forma del hueso producido y a actuar como barrera para la osificación heterotópica.

En cada conejo, se realizaron dos defectos con una trefina de 8 mm de diámetro. Debido al poco espesor que posee la calota de este modelo animal, hay que tener especial cuidado en no producir perforaciones en el sistema nervioso central del sujeto, entrando de forma oblicua al principio y enderezando después la trefina aplicando una leve presión. Sólo se pretende profundizar en la cortical externa y en el hueso esponjoso, dejando intacta la cortical interna. En la parte izquierda del cráneo se colocó la cerámica control, mientras que en el defecto del lado derecho se colocó la cerámica activada con quitosano/rhBMP-2. Finalmente se procedió a la sutura del periostio mediante puntos simples y a la sutura continúa cutánea.

En la Figura 5 A. se observa el tamaño del defecto no crítico provocado en el cráneo de los conejos mediante la utilización de una trefina. En la Figura 5 B. se presenta el defecto relleno con las muestras.



**Figura 5.** (A) Defecto no-crítico realizado en el cráneo del conejo. (B) Cirugía de cráneo de conejo donde se implantó en la parte derecha las muestras de cerámica activada (quitosano/rhBMP-2) y en la parte izquierda las muestras de cerámica control.

Basado en la experiencia recopilada de las cerámicas de fosfato de calcio, se seleccionaron, para los estudios *in vivo*, dos periodos de implantación diferentes: 4 y 12 semanas. De este modo, transcurrido el tiempo de implantación, los sujetos fueron sacrificados mediante inyección con pentobarbital sódico. Se procedió, tras ello, a la incisión para permitir el acceso directo a la zona intervenida. Se extrae una porción

pentagonal del cráneo incluyendo los defectos realizados en la primera cirugía utilizando una Dremel® para realizar los cortes (Figura 6). Debido a que el cráneo de conejo tiene un tamaño relativamente pequeño, se debe tener una gran destreza a la hora de extraer esta pieza sin dañar ni alterar los defectos ni las muestras, para permitir así su estudio completo y correcto.

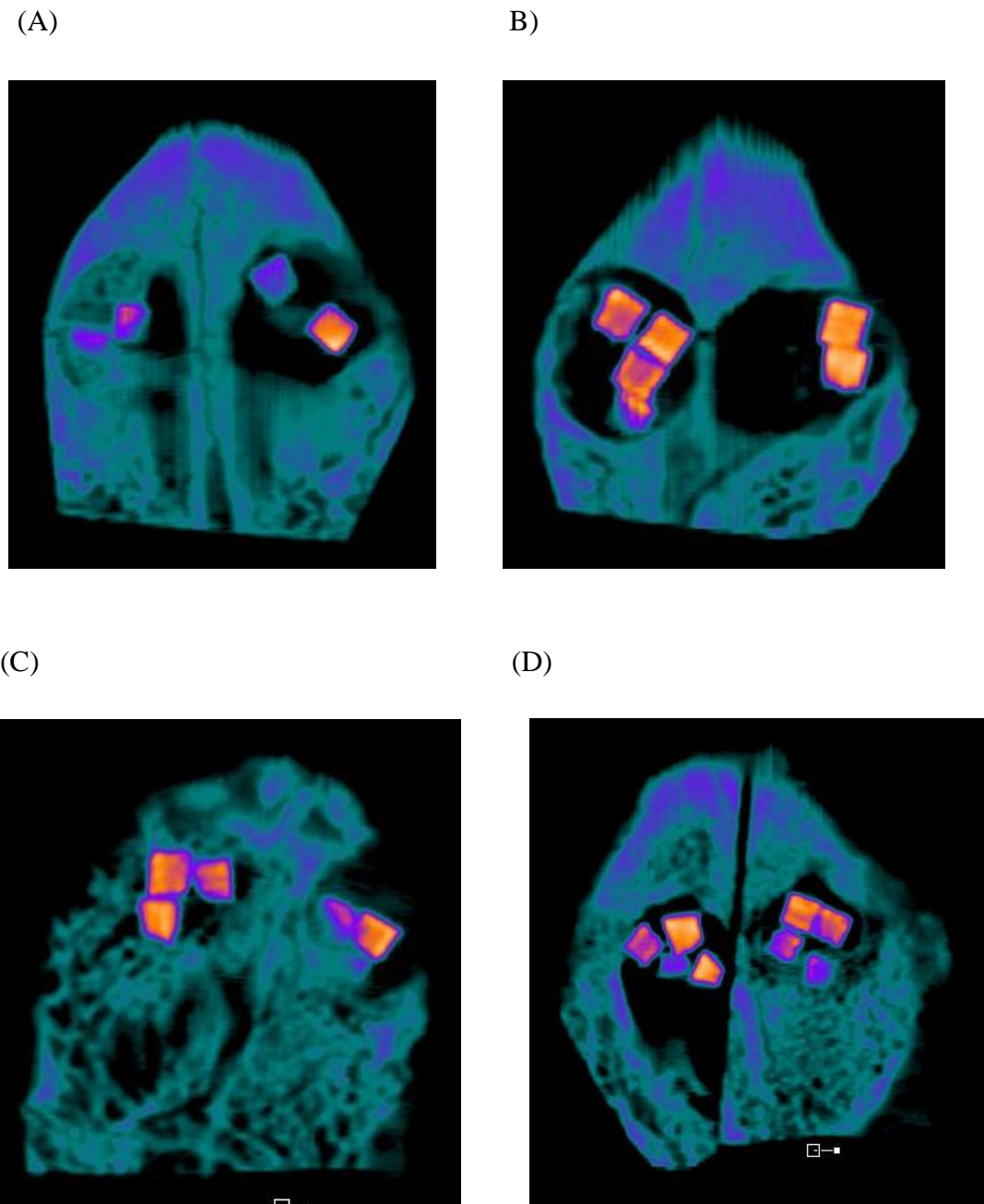
Finalmente, las muestras fueron evaluadas macroscópicamente, por  $\mu$ -CT, y por técnicas histológicas.



**Figura 6.** Porción de cráneo extraída en el sacrificio que incluyen los defectos realizados en la primera cirugía con las cerámicas.

Se realizó la  $\mu$ -CT con la intención de obtener una reconstrucción tridimensional del tejido óseo formado. Según se aprecia en la imagen de  $\mu$ -CT de la Figura 7 A y 7 B pertenecientes al sujeto C1 y C2 respectivamente, tanto en la calota derecha como en la izquierda (a las 4 semanas de la operación) no se observa una regeneración ósea manifiesta, y las muestras de HAp no están integradas en el tejido ni han sido degradadas. En la figura 7 C y 7 D se muestra la  $\mu$ -CT del sujeto C3 y C4 respectivamente, donde se puede observar que existe (a las 12 semanas de la operación), una mayor densidad ósea en el lado derecho, semejante a la del tejido óseo circundante, con respecto al lado izquierdo (donde se colocaron las cerámicas control). A su vez se aprecia la integración de las muestras de HAp en el tejido, aunque se mantienen sin degradar.





**Figura 7.** Imagen de  $\mu$ -CT de los defectos realizados en el cráneo. (A) y (B) Imagen de  $\mu$ -CT de los sujetos C1 y C2 respectivamente en las que no existe una regeneración ósea a las 4 semanas post-operación y las cerámicas no se encuentran integradas. En cambio en (C) Y (D) la imagen de  $\mu$ -CT de los sujetos C3 y C4 respectivamente revela formación de tejido óseo (defecto relleno en el lado derecho con respecto al lado control) tras 12 semanas de la operación. No se observa degradación de las cerámicas en ningún caso.

La Figura 8 muestra el aspecto macroscópico de los defectos transcurridas 4 semanas desde la implantación en los sujetos C1 y C2 y 12 semanas en los sujetos C3 y C4.

En todos los defectos aparecen las cerámicas de HAp casi en su totalidad, con una degradación apenas perceptible. Tampoco aparecen signos de inflamación, infección ni rechazo de las muestras, mostrando así la aparente biocompatibilidad de los componentes implantados. Se expone la imagen del sujeto C1 (Figura 8A) a modo de ejemplo del periodo de implantación de 4 semanas. En ella, tanto en la calota derecha (imagen de la derecha) como en la calota izquierda (imagen de la izquierda), no se observa una regeneración ósea evidente alrededor de las cerámicas, y éstas no se encuentran integradas.

Por otra parte, se muestran las fotos del sujeto C3 (Figura 8.B) como ejemplo del periodo de implantación de 12 semanas. Se observa una integración de la HAp y una regeneración ósea del defecto completas en el lado derecho (cerámica activada), en comparación con el lado izquierdo control. Cabe destacar la gran diferencia que existe entre la formación de hueso nuevo y la integración de las cerámicas entre los dos puntos temporales siendo mucho más evidente a las 12 semanas post cirugía.



**Figura 8.** Examen macroscópico de los defectos. En estas fotografías se muestra las piezas extraídas de cráneo transcurridas 4 semanas (A) y 12 semanas (B) desde la cirugía. (A) Sujeto C1 con ambas calotas sin regeneración ósea evidente de los defectos y con las muestras de HAp no integradas. (B) Sujeto C3 donde se observa una integración de HAp y una regeneración ósea completa en el lado derecho (cerámica activada).

Para determinar el grado de regeneración ósea experimentada en los defectos realizados sobre la calota de los sujetos de experimentación, se realizaron preparaciones histológicas tras la descalcificación de las muestras con ácido clorhídrico durante cinco días y su posterior deshidratación e inclusión en parafina.

Se empleó como método para la identificación de la mineralización del hueso, la tinción Tricrómica de Masson (TM). En ella, la queratina, los glóbulos rojos y el tejido muscular se tiñen de rojo (A); las fibras de colágeno y el tejido conjuntivo se tiñen de verde (B) y los núcleos celulares de lila o marrón (C). Las fibras de colágeno y tejido conjuntivo participan en los procesos de osificación, por lo que la aparición de tinción verde destaca estos procesos en los cortes histológicos.

En la Figura 9 y 10 se muestran los cortes histológicos con aumentos 5X y 20X con tinción de TM de los defectos realizados en la calota de los sujetos C1/C2 y C3/C4 respectivamente.

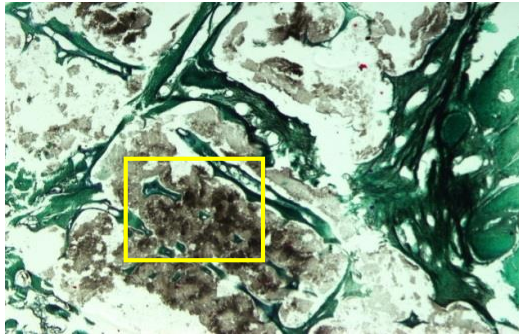
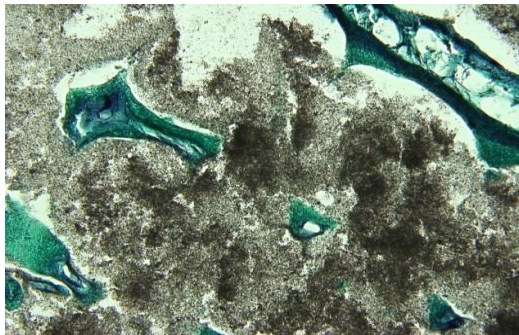
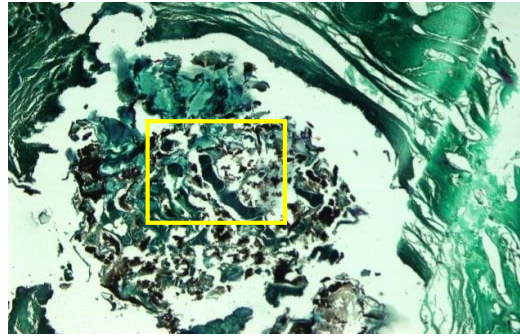
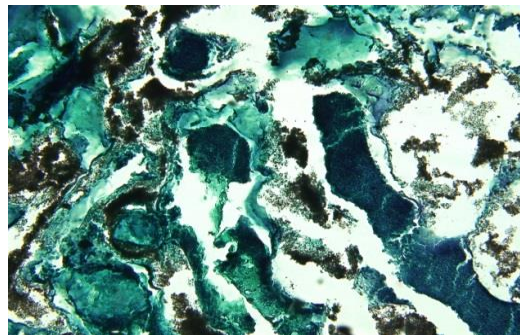
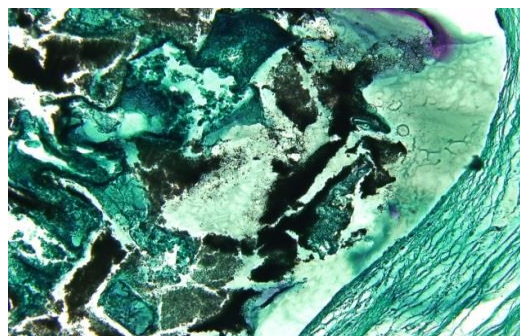
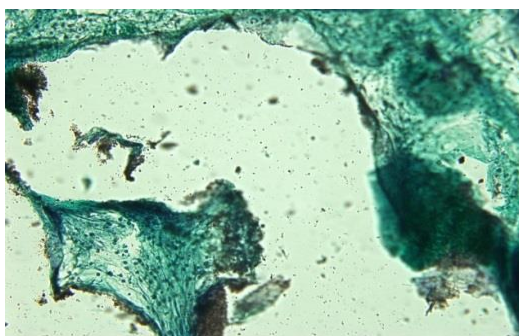
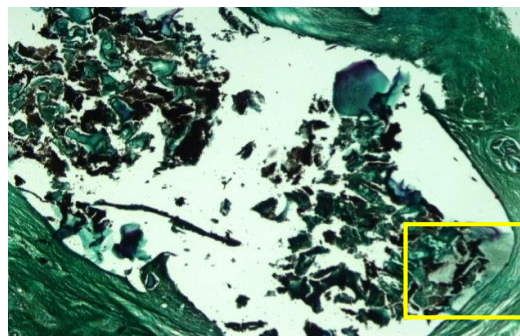
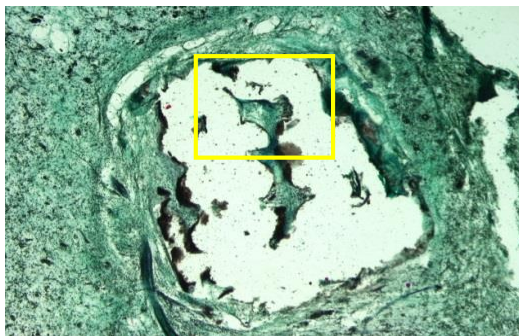
En ningún corte histológico se observó ninguna alteración morfológica que pueda indicar un rechazo ni a las cerámicas control ni a las cerámicas activadas por parte del sujeto, lo que demuestra la biocompatibilidad de todos los componentes implantados: cerámicas de HAp, PRP, quitosano y rhBMP-2.

Las zonas vacías de color blanco corresponden con la cerámica no degradada, que tras el paso de descalcificación, desaparece casi en su totalidad, observándose, en todos los defectos, los restos de la misma con una coloración marrón/beige en su interior mediante la tinción de TM.

En el defecto derecho de C1 y C2 (Figura 9), donde se implantó la cerámica activada, se observó una mayor regeneración de tejido óseo, respecto al lado control, al tener una coloración verde azulada que corresponde a zonas no maduras de hueso formadas por fibras densas de colágeno no calcificado, pero donde ya está presente la vascularización. La coloración en el interior de la muestra control no presentaba esta tonalidad verdosa, por lo que se concluyó la existencia de un menor grado de regeneración ósea en comparación con el defecto donde se implantó la cerámica activada. Este tejido neoformado se observó tanto en el interior de los poros de las muestras de HAp (Zona A) como alrededor de las mismas (Zona B).

Estas apreciaciones fueron más evidentes en los sujetos C3 y C4 (Figura 10), donde el hueso nuevo es más abundante y presenta una mayor organización. Se observó cómo el tratamiento con rhBMP-2 provocó la aparición de un tejido que se tiñe positivamente de verde por la presencia de colágeno. Es posible que, en este caso, la rhBMP-2 haya inducido a las células mesenquimales a diferenciarse a fenotipo osteoblástico y a sintetizar matriz osteoide. Todos estos datos indicaron que se ha formado hueso nuevo en el interior de la estructura porosa de la cerámica activada.

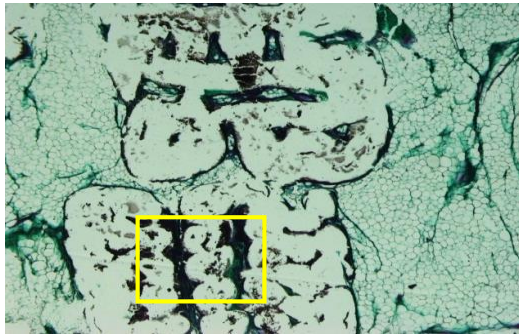


**C1-IZQUIERDA****C1-DERECHA****C2-IZQUIERDA****C2-DERECHA**

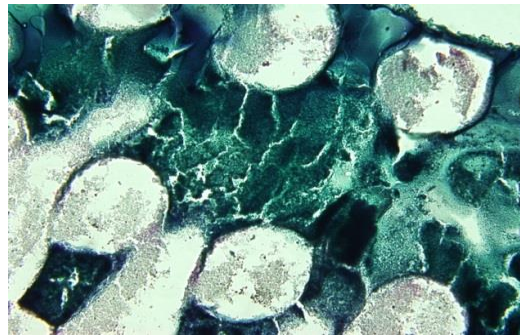
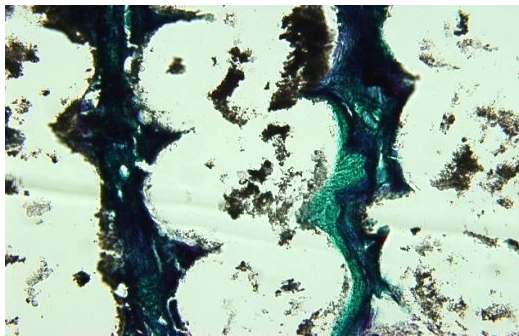
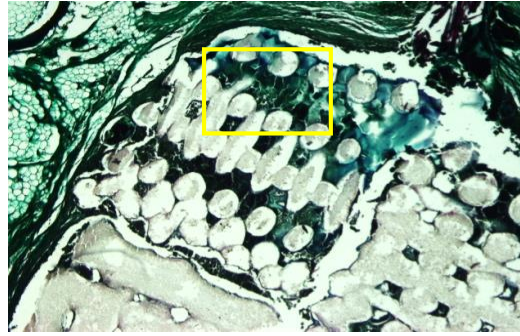
**Figura 9.** Imágenes histológicas del Sujeto C1 y C2 empleando TM. Defecto calota derecha corresponde a las muestras activadas (imágenes derechas) con aumentos al microscopio 5X (imagen superior) y 20X (imagen inferior). Defecto calota izquierda, correspondiente a muestras control (imágenes izquierdas) con los mismos aumentos y en la misma posición. Zona A. Hueso neoformado en el interior de la cerámica de HAp. Zona B. Hueso neoformado en el espacio comprendido entre la cerámica de HAp y el tejido óseo circundante.



**C3-IZQUIERDA**

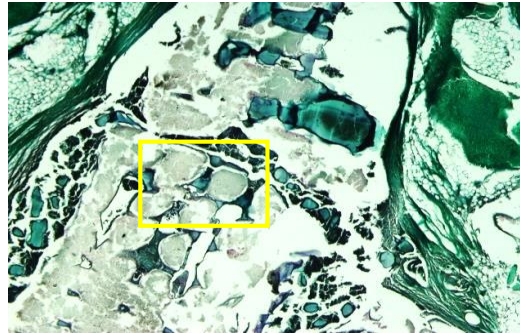
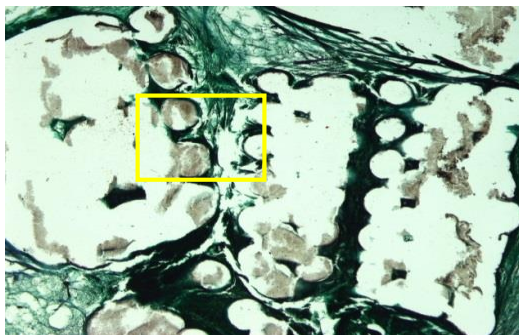


**C3-DERECHA**



**C4-IZQUIERDA**

**C4-DERECHA**



**Figura 10.** Imágenes histológicas del Sujeto C3y C4 empleando TM. Defecto calota derecha corresponde a las muestras activadas (imágenes derechas) con aumentos al microscopio 5X (imagen superior) y 20X (imagen inferior). Defecto calota izquierda, correspondiente a muestras control (imágenes izquierdas) con los mismos aumentos y en la misma posición.

### **III. DISCUSIÓN**

## 6. DISCUSIÓN

Un área de investigación profundamente activa es la implantación de injertos óseos naturales o biomateriales sintéticos capaces de rellenar defectos óseos, de tamaño crítico o no, y conseguir una completa regeneración del tejido (Guo, J. y cols., 2012). Los defectos de tamaño crítico en el hueso maxilofacial son muy comunes, a menudo como resultado de la escisión de un tumor, el curetaje de un quiste, una fractura conminuta, o por un desbridamiento quirúrgico repetido como ocurre en el tratamiento de la osteomielitis crónica o osteoradionecrosis. Debido a su tamaño, descrito como crítico en 15mm de diámetro en modelo calota de conejo, son defectos que no se curan por sí mismos, y por tanto, es necesario desarrollar nuevos sistemas capaces de inducir y mejorar la formación de hueso nuevo (Dodde, R., 2 y cols., 2000).

En cambio, los defectos de tamaño no crítico cursan con una formación de hueso que tiene lugar durante las primeras doce semanas, tal y como se describe en la literatura. A las seis semanas, el hueso es más abundante en el exterior del defecto y va progresando hacia el interior del mismo durante las seis semanas siguientes (von Doernberg, M. y cols., 2006).

Este estudio se centra en la regeneración de defectos de tamaño no crítico empleando para ello cerámicas de HAp con PRP activadas o no con quitosano/rhBMP-2 en defectos craneales de conejos durante 4 y 12 semanas post cirugía.

Los sistemas de andamiaje idóneos deben proporcionar las condiciones óptimas para el crecimiento vascular y celular, y la liberación de los factores de crecimiento. Estos sistemas de soporte deben ser obtenidos de forma reproducible, no tóxicos, biocompatibles, moldeables y proporcionar espacio suficiente para la regeneración del tejido óseo (Wikeshjö, U., M.E. y cols., 2003). Actualmente se están desarrollando una gran variedad de sistemas de soporte para la aplicación de rhBMP-2 en modelos animales.

Las cerámicas de fosfato de calcio tales como HAp y  $\beta$ -TCP se han investigado con frecuencia como sustitutos óseos debido a su estrecha semejanza química a los minerales presentes en la propia matriz ósea. Estos biomateriales presentan una adecuada biocompatibilidad y permiten el crecimiento y desarrollo del nuevo tejido en su interior, siendo osteoconductores. No obstante, presentan ciertas limitaciones, como



una biodegradación impredecible, un proceso de obtención costoso y una baja capacidad de osteoinducción, siendo clave la modificación y/o combinación con otros materiales que mejoren sus propiedades. Mediante la creación de macroporosidad, se consigue favorecer el crecimiento óseo y la osteointegración, ya que permite la circulación de sangre y, a su vez, la migración celular para la adecuada regeneración ósea. Además, al aumentar el área superficial del injerto se consigue acortar su tiempo de reabsorción.

Existen numerosos estudios que se basan en el empleo de cerámicas de HAp para la regeneración de tejido óseo. Se ha demostrado que las partículas de HAp son poco biorreabsorbibles, de hecho, no se observó una sustitución ósea completa en reconstrucción craneofacial de pacientes (Alam, M.I. y cols., 2001). Los resultados obtenidos en este trabajo muestran la presencia de las cerámicas de HAp tanto a las 4 como a las 12 semanas, siendo evidente la degradación lenta en contacto con los tejidos biológicos. Además, la degradación de las cerámicas está influenciada por diversos factores tales como la especie animal, el lugar de implantación y la geometría del implante. En un estudio realizado por del Real y colaboradores mostraron la degradación de un 80% de las cerámicas cilíndricas de fosfato de calcio cuando éstas estaban en contacto directo con el tejido óseo circundante, tras 10 semanas implantadas en un defecto condilar de cabra (del Real, R.P. y cols., 2003). La geometría cúbica de nuestras muestras, tanto si están recubiertas o no con proteína y quitosano, mostraron una mayor resistencia a la degradación de las mismas, ya que no estuvieron en contacto directo en todo momento con tejido óseo.

En nuestro caso, es necesario mayor tiempo de implantación hasta que la cerámica queda totalmente rodeada de tejido óseo *de novo*. Por consiguiente, la manifestación de los osteoclastos y la degradación de la HAp ocurren más tardíamente.

Nuestros resultados han demostrado la adecuada biocompatibilidad de este material, donde el análisis macroscópico de las muestras recogidas han revelado el inicio del cierre de los defectos aún en el caso de las cerámicas sin activar. La ausencia de signos de inflamación e infección confirma de nuevo que es un material adecuado para su empleo en defectos óseos.

A través del análisis histológico de todas las secciones, se pudo comprobar la integración de las muestras, ya que no se observó la formación de ninguna cápsula fibrosa alrededor de los implantes.

Existen numerosos estudios clínicos basados en el empleo del PRP ejerciendo una evidente acción positiva en el proceso de regeneración tisular en ensayos *in vitro*. Los resultados *in vivo*, en cambio, muestran cierta controversia. Se han publicado resultados contradictorios sobre el uso de PRP como fuente natural de fibrina con el fin de optimizar las propiedades de materiales de sustitución ósea. Se encontró que la fibrina combinada con un sustituto óseo (Bio-OSS, Wolhusen, Suiza) no aumentó la regeneración de hueso en defectos experimentales en la mandíbula de perro (Carmagnola, D, y cols., 2002). En contraste a esta observación, la adición de un sellante de fibrina a un biomaterial cerámico reabsorbible mejoró significativamente la formación de hueso en defectos realizados en tibia de conejos (Kania, R.E. y cols., 1998). Jung y colaboradores observaron que el uso de PRP no mostraba ninguna mejora significativa en la regeneración de defectos óseos de tamaño no crítico en el cráneo de conejos, en cambio, el análisis histomorfométrico mostró que la combinación de rhBMP-2 con PRP mejoraba significativamente la densidad de área de hueso nuevo en los defectos preparados. En general, concluyeron que el PRP en combinación con hueso autólogo conduce a una regeneración ósea significativa, resultado de la supervivencia de los osteoblastos, osteocitos y preosteoblastos presentes en el injerto de hueso autólogo.

No obstante, estos estudios coinciden en, al menos, dos puntos fundamentales: se observaron mejoras visibles de la cicatrización de los tejidos blandos y una mayor cohesividad en los injertos particulados (Beca, T. y cols., 2007). Por lo tanto se decidió añadir tanto a las cerámicas de HAp control como a las cerámicas activadas, PRP con el objetivo de crear un gel que mantuviese unidas las cuatro muestras de HAp que se implantaron en cada defecto.

Tomoyasu y colaboradores, por su parte, también experimentaron la mejora en la regeneración ósea cuando se combinaba rhBMP-2 con PRP, concluyendo que la actividad estimuladora de PRP en la curación del hueso *in vivo* se debería a la estimulación de la proliferación de células progenitoras por los factores de crecimiento liberados a partir de las plaquetas activadas. Descubrieron que empleando concentraciones bajas del PRP se estimulaba la diferenciación osteoblástica en presencia de BMPs, mientras que a concentraciones más altas se estimulaba la proliferación pero se suprimía la diferenciación osteoblástica. Yoshida y colaboradores, obtuvieron los mismos resultados observando una aceleración evidente de la formación de hueso a partir de la primera etapa, una regeneración de abundante tejido de hueso

denso y la demostración de un efecto sinérgico entre el PRP y la rhBMP2 sobre una cerámica de fosfato de calcio, en donde el efecto angiogénico del PRP puede proporcionar una mejora de la perfusión vascular para que la rhBMP2 pueda reclutar más células osteoprogenitoras de la médula ósea del huésped (Jung, R.E. y cols., 2005; Tomoyasu, A. y cols., 2007; Yoshida, K. y cols., 2013). En nuestro estudio, al colocar PRP tanto en las cerámicas control, como en las cerámicas activadas, no se ha podido establecer el efecto que puede producir el PRP sobre la regeneración ósea, por lo que en futuros experimentos tendremos en cuenta este punto.

La liberación de la rhBMP-2 desde las cerámicas es un factor clave para el éxito de la regeneración del tejido. En particular, una liberación inicial explosiva de rhBMP-2 puede ser, en determinados casos, beneficioso para promover la formación de hueso. Sin embargo, también puede causar efectos biológicos adversos, como reacciones inflamatorias. Si bien una reducción en la dosis de rhBMP-2 *in vivo* podría reducir estos efectos secundarios, a menudo se requiere una dosis alta para inducir la formación ósea de forma significativa (Xiao, W. y cols., 2013). Cha y colaboradores evaluaron la cantidad de factor rhBMP-2 necesaria en experimentos de elevación de seno en perro desde cerámicas de HAp y colágeno, observando que el aumento de dosis de rhBMP-2 más allá de un cierto umbral no mejora la regeneración ósea (Cha, J. y cols., 2014). En este trabajo de investigación hemos empleado 100 µg de proteína siendo una cantidad ampliamente utilizada en nuestro grupo de investigación y la cual ha mostrado ser efectiva en la curación de defecto óseos en conejos (Lopez-Lacombe et al, 2006: Abarrategi et al., 2008).

Xiao y colaboradores evaluaron la formación de tejido óseo *de novo* en defectos realizados en calota de rata a las 3 y 6 semanas post cirugía. Para ello emplearon esferas de HAp recubiertas de rhBMP-2 observando la misma cantidad de nuevo hueso formado en ambos puntos temporales, es decir, un aumento en el tiempo no condujo a una mejora en los resultados (Xiao, W. y cols., 2013). Al realizar el análisis histológico de las muestras recogidas en nuestro ensayo (implantadas en calota de conejo), se observó una regeneración ósea superior en los defectos con las cerámicas activadas con quitosano y rhBMP-2 con respecto a las cerámicas control, en ambos puntos temporales (4 y 12 semanas) siendo más evidente tras 12 semanas de la intervención quirúrgica. Cabe mencionar la existencia de tejido óseo neoformado en el interior de la estructura de la HAp (Véase Figura 9, zona A) presentado dicha estructura una porosidad

adecuada que permite el crecimiento y el desarrollo de este tejido, destacando así, su poder osteoconductor.

Wikesjö y colaboradores., evaluaron el potencial de la rhBMP-2 asociada a una esponja de colágeno para mejorar la regeneración ósea guiada usando un dispositivo de politetrafluoroetileno en modelo animal de perro, demostrando que la formación ósea fue significativamente superior en los defectos donde fueron colocadas las esponjas con rhBMP-2 en comparación con los controles (Wikesjö U,M.E y cols., 2004). La mejora en la regeneración ósea, se ha observado cuando el colágeno se combina con materiales de injerto consistentes como HAp/TCP, favoreciendo la estabilidad del implante, la integración en el tejido y acelerando los procesos de diferenciación de los osteoblastos mediante el aporte de iones específicos como el calcio (Barboza E.P.y cols, 2000; Lee S. y cols., 2014). Si bien se reconoce que el colágeno es uno de los materiales de soporte más investigados, diferentes estudios han documentado la regeneración insuficiente de hueso cuando se utiliza solo como sustituto de injerto óseo relacionado con una rápida degradación *in vivo* y rápida liberación de la proteína

Debido a las limitaciones que presenta el uso de colágeno para liberar factores de crecimiento, se ha seleccionado el quitosano que demostrado ser un polímero adecuado para la liberación de la rhBMP-2 (Civantos, A. 2014).

La incorporación del quitosano a la HAp fue en forma de recubrimiento, pues se ha descrito en otros trabajos que este polímero puede reducir de forma significativa la resistencia de la muestra (Takagi S. y cols., 2003). Además, la incorporación de la proteína no se puede realizar de forma directa al preparar la cerámica, ya que se inactiva durante el proceso de fraguado. Numerosos estudios emplean la proteína rhBMP-2 adsorbida al material de HAp, sin embargo, cabe destacar que durante el proceso de recubrimiento, esterilización y almacenamiento, la rhBMP-2 puede perder su función (Lee, S. y cols., 2014).

Por este motivo hemos incorporado el factor rhBMP-2 en quitosano que no solo permite obtener filmes que recubren los biomateriales sino que además protege al factor de los procesos de esterilización.

Por todo lo anteriormente expuesto podemos afirmar que la HAp proporciona refuerzo a la matriz y osteoconductividad y, por otro lado, el quitosano modula ciertas propiedades

como la degradación y la integración, a la vez que controla la velocidad de liberación del factor de crecimiento, logrando así una combinación prometedora como se puede observar en los resultados obtenidos.

## 7. CONCLUSIONES

- Se ha logrado activar con éxito cerámicas de HAp, con un tamaño de poro y fuerza mecánica adecuada, con un recubrimiento de quitosano que actúa como transportador de rhBMP-2. Estas cerámicas desarrolladas, activas o no, poseen una morfología macroporosa adecuada demostrando la osteoconductividad de este material, así como un buen perfil de biocompatibilidad, al no observarse ninguna alteración morfológica adversa ni signos de infección o rechazo.
- El estudio con  $\mu$ -CT, así como la observación macroscópica, muestra la falta de bioreabsorción de las cerámicas de HAp control y activadas a las 4 y a las 12 semanas de su implantación, siendo las activadas las que se encontraron mejor integradas.
- Se ha conseguido una mejora en las propiedades de las cerámicas porosas de HAp con la adición de recubrimientos activos de quitosano/rhBMP-2 para la neoformación ósea en su aplicación en ingeniería de tejido óseo.

## **V. BIBLIOGRAFÍA**

## 8. BIBLIOGRAFÍA

Abarrategi A, Moreno-Vicente C, Martínez-Vázquez FJ, Civantos A, Ramos V, Sanz-Casado J, et al. Biological properties of solid free form designed ceramic scaffolds with BMP-2: in vitro and in vivo evaluation. PLoS One 2012;7(3):e34117-e34117.

Alam MI, Asahina I, Ohmamiuda K, Takahashi K, Yokota S, Enomoto S. Evaluation of ceramics composed of different hydroxyapatite to tricalcium phosphate ratios as carriers for rhBMP-2. Biomaterials 2001 06;22(12):1643-1651.

Arnaout MA, Goodman SL, Xiong J. Coming to grips with integrin binding to ligands. Curr Opin Cell Biol 2002 10;14(5):641-651.

Ashammaki N, Ferretti P. Topics in tissue engineering. 1a ed. Oulu: University of Oulu. 2003.

Barboza EP, Duarte ME, Geolás L, Sorensen RG, Riedel GE, Wikesjö U.M. Ridge augmentation following implantation of recombinant human bone morphogenetic protein-2 in the dog. J Periodontol 2000 03;71(3):488-496.

Beca T, Hernández G, Morante S, Bascones A. Plasma rico en plaquetas. Una revisión bibliográfica. Av Periodon Implantol. 2007;19(1):39-52.

Bragdon B, Moseychuk O, Saldanha S, King D, Julian J, Nohe A. Bone morphogenetic proteins: a critical review. Cell Signal 2011 04;23(4):609-620.

Cai Y, Wang X, Poh CK, Tan HC, Soe MT, Zhang S, et al. Accelerated bone growth in vitro by the conjugation of BMP2 peptide with hydroxyapatite on titanium alloy. Colloids Surf B Biointerfaces 2014 04/01;116:681-686.

Carmagnola D, Berglundh T, Lindhe J. The effect of a fibrin glue on the integration of Bio-Oss with bone tissue. A experimental study in labrador dogs. J Clin Periodontol 2002 05;29(5):377-383.



Carreira AC, Alves GG, Zambuzzi WF, Sogayar MC, Granjeiro JM. Bone Morphogenetic Proteins: structure, biological function and therapeutic applications. Arch Biochem Biophys 2014 07/17.

Cha J, Lee J, Kim M, Choi S, Cho K, Jung U. Sinus augmentation using BMP-2 in a bovine hydroxyapatite/collagen carrier in dogs. J Clin Periodontol 2014 01;41(1):86-93.

Civantos A. Caracterización físico-química y biológica de filmes de quitosano como transportadores de la rhBMP-2 en la regeneración del tejido óseo. UCM. 2014

Cunningham NS, Paralkar V, Reddi AH. Osteogenin and recombinant bone morphogenetic protein 2B are chemotactic for human monocytes and stimulate transforming growth factor beta 1 mRNA expression. Proc Natl Acad Sci U S A 1992 12/15;89(24):11740-11744.

Deckers MML, van Bezooijen R,L., van dH, Hoogendam J, van DB, Papapoulos SE, et al. Bone morphogenetic proteins stimulate angiogenesis through osteoblast-derived vascular endothelial growth factor A. Endocrinology 2002 04;143(4):1545-1553.

del Real ,R.P., Ooms E, Wolke JGC, Vallet-Regí M, Jansen JA. In vivo bone response to porous calcium phosphate cement. J Biomed Mater Res A 2003 04/01;65(1):30-36.

Dodde R, 2, Yavuzer R, Bier UC, Alkadri A, Jackson IT. Spontaneous bone healing in the rabbit. J Craniofac Surg 2000 07;11(4):346-349.

Pereira F.H. Efecto de la Temperatura y el Tiempo de Sinterización en la Densidad y el Tamaño de Grano del beta-Fosfato Tricálcico. Universidad: de Extremadura, 2010.

Fiedler Jö, Röderer G, Günther K, Brenner RE. BMP-2, BMP-4, and PDGF-bb stimulate chemotactic migration of primary human mesenchymal progenitor cells. J Cell Biochem 2002;87(3):305-312.

Groeneveld EH, Burger EH. Bone morphogenetic proteins in human bone regeneration. *Eur J Endocrinol* 2000 01;142(1):9-21.

Guo J, Meng Z, Chen G, Xie D, Chen Y, Wang H, et al. Restoration of critical-size defects in the rabbit mandible using porous nanohydroxyapatite-polyamide scaffolds. *Tissue Eng Part A* 2012 06;18(11-12):1239-1252.

Guzmán R, Nardecchia S, Gutiérrez M,C., Ferrer ML, Ramos V, del Monte F, et al. Chitosan scaffolds containing calcium phosphate salts and rhBMP-2: in vitro and in vivo testing for bone tissue regeneration. *PLoS One* 2014 02/04;9(2):e87149-e87149.

Hirano S, Tsuchida H, Nagao N. N-acetylation in chitosan and the rate of its enzymic hydrolysis. *Biomaterials* 1989 10;10(8):574-576. (17) Hollinger JO, Kleinschmidt JC. The critical size defect as an experimental model to test bone repair materials. *J Craniofac Surg* 1990 01;1(1):60-68.

Hollister MC, Weintraub JA. The association of oral status with systemic health, quality of life, and economic productivity. *J Dent Educ* 1993 12;57(12):901-912.

Ikeda T, Ikeda K, Yamamoto K, Ishizaki H, Yoshizawa Y, Yanagiguchi K, et al. Fabrication and characteristics of chitosan sponge as a tissue engineering scaffold. *Biomed Res Int* 2014;2014:786892-786892.

Jun S, Lee E, Jang T, Kim H, Jang J, Koh Y. Bone morphogenic protein-2 (BMP-2) loaded hybrid coating on porous hydroxyapatite scaffolds for bone tissue engineering. *J Mater Sci Mater Med* 2013 03;24(3):773-782.

Jung RE, Glauser R, Schärer P, Hämmerle C,H.F., Sailer HF, Weber FE. Effect of rhBMP-2 on guided bone regeneration in humans. *Clin Oral Implants Res* 2003 10;14(5):556-568.

Jung RE, Schmoekel HG, Zwahlen R, Kokovic V, Hammerle CHF, Weber FE. Platelet-rich plasma and fibrin as delivery systems for recombinant human bone morphogenetic protein-2. *Clin Oral Implants Res* 2005 12;16(6):676-682.

Kania RE, Meunier A, Hamadouche M, Sedel L, Petite H. Addition of fibrin sealant to ceramic promotes bone repair: long-term study in rabbit femoral defect model. *J Biomed Mater Res* 1998 98;43(1):38-45.

Kempen DHR, Lu L, Hefferan TE, Creemers LB, Maran A, Classic KL, et al. Retention of in vitro and in vivo BMP-2 bioactivities in sustained delivery vehicles for bone tissue engineering. *Biomaterials* 2008 08;29(22):3245-3252.

Kessler S, Kastler S, Mayr-Wohlfart U, Puhl W, Günther ,K.P. [Stimulation of primary osteoblast cultures with rh-TGF-beta, rh-bFGF, rh-BMP 2 and rx-BMP 4 in an in vitro model]. *Orthopade* 2000 02;29(2):107-111.

Kim J, McBride S, Dean DD, Sylvia VL, Doll BA, Hollinger JO. In vivo performance of combinations of autograft, demineralized bone matrix, and tricalcium phosphate in a rabbit femoral defect model. *Biomed Mater* 2014 06;9(3):035010-035010.

Lanza R, Langer R, Vacanti J. *Principles of Tissue Engineering*. 3a ed. Burlington: Elsevier Academic Press. 2000.

Lee S, Hahn B, Kang TY, Lee M, Choi J, Kim M, et al. Hydroxyapatite and collagen combination-coated dental implants display better bone formation in the peri-implant area than the same combination plus bone morphogenetic protein-2-coated implants, hydroxyapatite only coated implants, and uncoated implants. *J Oral Maxillofac Surg* 2014 01;72(1):53-60.

Li G, Cui Y, McIlmurray L, Allen WE, Wang H. rhBMP-2, rhVEGF(165), rhPTN and thrombin-related peptide, TP508 induce chemotaxis of human osteoblasts and microvascular endothelial cells. *J Orthop Res* 2005 05;23(3):680-685.

López-Lacomba ,J.L., García-Cantalejo ,J.M., Sanz Casado ,J.V., Abarategi A, Correias Magaña V, Ramos V. Use of rhBMP-2 activated chitosan films to improve osseointegration. *Biomacromolecules* 2006 03;7(3):792-798.

Marx RE, Carlson ER, Eichstaedt RM, Schimmele SR, Strauss JE, Georgeff KR. Platelet-rich plasma: Growth factor enhancement for bone grafts. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 1998 06;85(6):638-646.

Percival CJ, Richtsmeier JT. Angiogenesis and intramembranous osteogenesis. *Dev Dyn* 2013 08;242(8):909-922.

Rezania A, Healy KE. Integrin subunits responsible for adhesion of human osteoblast-like cells to biomimetic peptide surfaces. *J Orthop Res* 1999 07;17(4):615-623.

Ruhé PQ, Kroese-Deutman H, Wolke JGC, Spauwen PHM, Jansen JA. Bone inductive properties of rhBMP-2 loaded porous calcium phosphate cement implants in cranial defects in rabbits. *Biomaterials* 2004 05;25(11):2123-2132.

Ruhé ,P.Q., Boerman OC, Russel FGM, Spauwen PHM, Mikos AG, Jansen JA. Controlled release of rhBMP-2 loaded poly(dl-lactic-co-glycolic acid)/calcium phosphate cement composites in vivo. *J Control Release* 2005 08/18;106(1-2):162-171.

Runyan CM, Ali ST, Chen W, Calder BW, Rumburg AE, Billmire DA, et al. Bone tissue engineering by way of allograft revitalization: mechanistic and mechanical investigations using a porcine model. *J Oral Maxillofac Surg* 2014 05;72(5):1000.e1-1000.11.

Schneider GB, Zaharias R, Seabold D, Keller J, Stanford C. Differentiation of preosteoblasts is affected by implant surface microtopographies. *J Biomed Mater Res A* 2004 06/01;69(3):462-468.

Sipe JD. Tissue engineering and reparative medicine. *Ann N Y Acad Sci* 2002 06;961:1-9.

Takagi S, Chow LC, Hirayama S, Eichmiller FC. Properties of elastomeric calcium phosphate cement-chitosan composites. *Dent Mater* 2003 12;19(8):797-804.

Tomoyasu A, Higashio K, Kanomata K, Goto M, Kodaira K, Serizawa H, et al. Platelet-rich plasma stimulates osteoblastic differentiation in the presence of BMPs. *Biochem Biophys Res Commun* 2007 09/14;361(1):62-67.

von Doernberg M, von Rechenberg B, Bohner M, Grünenfelder S, van Lenthe GH, Müller R, et al. In vivo behavior of calcium phosphate scaffolds with four different pore sizes. *Biomaterials* 2006 10;27(30):5186-5198.

Wang EA, Rosen V, D'Alessandro J.S., Bauduy M, Cordes P, Harada T, et al. Recombinant human bone morphogenetic protein induces bone formation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1990 03;87(6):2220-2224.

Wang L, Park P, La Marca F, Than K, Rahman S, Lin C. Bone formation induced by BMP-2 in human osteosarcoma cells. *Int J Oncol* 2013 10;43(4):1095-1102.

Wikesjö U,M.E., Qahash M, Thomson RC, Cook AD, Rohrer MD, Wozney JM, et al. rhBMP-2 significantly enhances guided bone regeneration. *Clin Oral Implants Res* 2004 04;15(2):194-204.

Wikesjö U,M.E., Xiropaidis AV, Thomson RC, Cook AD, Selvig KA, Hardwick WR. Periodontal repair in dogs: space-providing ePTFE devices increase rhBMP-2/ACS-induced bone formation. *J Clin Periodontol* 2003 08;30(8):715-725.

Xiao W, Fu H, Rahaman MN, Liu Y, Bal BS. Hollow hydroxyapatite microspheres: a novel bioactive and osteoconductive carrier for controlled release of bone morphogenetic protein-2 in bone regeneration. *Acta Biomater* 2013 09;9(9):8374-8383.

Xu HHK, Simon,Carl G.,Jr. Fast setting calcium phosphate-chitosan scaffold: mechanical properties and biocompatibility. *Biomaterials* 2005 04;26(12):1337-1348.

Yokoyama A, Yamamoto S, Kawasaki T, Kohgo T, Nakasu M. Development of calcium phosphate cement using chitosan and citric acid for bone substitute materials. *Biomaterials* 2002 02;23(4):1091-1101.

Yoshida K, Sumita Y, Marukawa E, Harashima M, Asahina I. Effect of platelet-rich plasma on bone engineering with an alloplastic substitute containing BMP2. *Biomed Mater Eng* 2013;23(3):163-172.